

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Diplomski rad

Zagreb, rujan 2017.

Petra Bosanac, 860/BPI

**PROTEINSKI IZOLATI IZ ULJNIH
POGAČA LANA I KONOPLJE-
PRIPRAVA, KARAKTERIZACIJA
I BIOLOŠKA AKTIVNOST**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu HRZZ projekta IP-2016-06-3848 „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj životinjskih stanica“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Višnje Gaurina Srček.

Zahvaljujem mentorici prof.dr.sc. Višnji Gaurini Srček, prof.dr.sc. Igoru Slivcu i dipl.ing. Manuli Panić na uloženom vremenu, trudu i velikoj pomoći i podršci, te na svemu što su me naučili pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem i ostalim članovima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na pruženoj pomoći i savjetima pri odradi eksperimentalnog dijela rada.

Također, želim zahvaliti svojoj obitelji, prijateljima i dečku na iskazanoj podršci.

Vi ste moja motivacija za dalje, bolje i više!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

PROTEINSKI ISOLATI IZ ULJNIH POGAČA LANA I KONOPLJE-PRIPRAVA, KARAKTERIZACIJA I BIOLOŠKA AKTIVNOST

Petra Bosanac, 860/BPI

Sažetak: Posljednjih nekoliko desetljeća prisutan je porast korištenja organskih ostataka nakon prerade proizvoda iz različitih sektora poljoprivrede i industrije. Veliki potencijal primjene imaju uljne pogače koje zaostaju nakon ekstrakcije ulja i danas se uglavnom koriste kao stočna hrana ili gnojivo. Pogače lana i konoplje sadrže različite komponente koje se smatraju vrlo važnim za ljudsko zdravlje, a značajan dio predstavljaju proteini koji mogu imati potencijal u tehnologiji životinjskih stanica. U ovom radu provedena je priprava proteinskih izolata lana i konoplje iz dva različita uzorka pri čemu je dobiven udio proteina u rasponu 43,7-60,42% za lan, odnosno 27,7-48,12% za konoplju. Ispitan je i utjecaj različitih koncentracija izolata na proliferaciju HEK 293T stanične linije prilikom čega je utvrđeno da izolat lana nije stimulirao rast HEK 293T stanica u odnosu na standardni medij s 5% seruma, a izolat konoplje je pokazao inhibicijski učinak na rast stanica.

Ključne riječi: uljne pogače lana i konoplje, proteinski izolat, udio proteina, proliferacija stanica

Rad sadrži: 38 stranica, 10 slika, 5 tablica, 31 literaturni navod, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku (pdf format) pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Igor Slivac
2. Prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček
3. Doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
4. Prof. dr. sc. Ksenija Durgo (zamjena)

Datum obrane: 26. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Technology and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

**PROTEIN ISOLATES FROM FLAXSEED AND HEMPSEED CAKE - PREPARATION,
CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY**
Petra Bosanac, 860/BPI

Abstract: There has been an increased exploitation of organic residues from various sectors of agriculture and industries over the past few decades. Oil cakes, that remain after oil extraction from seeds, are mainly used as a feed source or fertilizer. Flaxseed and hempseed meal, the most interesting oil cakes today, contain various components considered to be of great importance to human health and a significant portion of proteins that can be used in animal cell technology. This thesis discusses various preparation of flax and hemp protein isolates in two different samples, whereby the protein fraction was obtained in the range of 43.7-60.42% in flax and 27.7-48.12% in the hemp protein isolate. In addition to flaxseed and hempseed meal, human HEK 293T cell line derived from the transformation of human embryonic kidney cells with DNA adenovirus 5 was also used. The influence of different isolate concentrations on the proliferation of HEK 293T cell line was determined, whereby the growth of HEK 293T cells was not stimulated by flax protein isolate in compare to the standard medium with 5% serum, and also, a hemp protein isolate showed an inhibitory effect on cell growth.

Keywords: flaxseed and hempseed meal, protein isolates, protein share, cell growth

Thesis contains: 38 pages, 10 figures, 5 tables, 31 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Ph.D. Višnja Gaurina Srček, Full Professor*

Reviewers:

1. Ph.D. Igor Slivac, Associate Professor
2. Ph. D. Višnja Gaurina Srček, Full Professor
3. Ph.D. Andreja Leboš Pavunc, Assistant Professor
4. Ph.D. Ksenija Durgo, Full Professor (substitute)

Thesis defended: September 26th, 2017.

SADRŽAJ	stranica
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Medij za uzgoj stanica	3
2.2.1. Razvoj medija bez seruma	4
2.1.2. Hidrolizati proteina kao sastojci medija bez seruma	5
2.2. Uljne pogače i njihova primjena u biotehnologiji	7
2.2.1. Važnost proizvodnje i sastav lana	8
2.2.2.1. Pogača lana	10
2.2.2. Važnost proizvodnje i sastav konoplje	10
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Materijali	13
3.1.1. Kemikalije	13
3.1.2. Otopine	14
3.1.3. Uređaji i oprema	16
3.1.4. Stanična linija HEK 293T	17
3.2. Metode rada	17
3.2.1. Priprava proteinskog izolata lana	17
3.2.2. Priprava proteinskog izolata konoplje	18
3.2.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u	20
3.2.4. Određivanje proteina po Kjeldahlu	21
3.2.5. SDS-PAG elektroforeza proteinskih izolata iz pogača lana i konoplje	23
3.2.6. Uzgoj HEK 293T stanica u T-bocama	24
3.2.7. Utjecaj dodatka izolata proteina na rast stanica i određivanje broja stanica metodom tripan-plavo	24

4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. Priprava proteinskih izolata iz pogača lana i konoplje i određivanje sadržaja proteina	26
4.2. Karakterizacija proteinskih izolata iz pogača lana i konoplje SDS- PAGE elektroforezom	30
4.3. Biološka aktivnost proteinskih izolata iz pogača lana i konoplje na HEK 293T stanicama	31
5. ZAKLJUČCI	34
6. LITERATURA	35

1.UVOD

Za uspješan rast, održavanje i produktivnost kultura životinjskih stanica potrebno je osigurati mikrookoliš koji omogućuje optimalan rast kulture stanica u in vitro uvjetima. Stoga medij za uzgoj mora sadržavati hranjive tvari, soli, hormone, faktore rasta te serum životinjskog porijekla. Tijekom zadnjih desetljeća, uočeni su ozbiljni rizici vezani uz korištenje sastojaka životinjskog ili humanog porijekla u proizvodnji terapeutika, a uglavnom su povezani s prijenosom infektivnih supstancija poput virusa i priona te otežanu izolaciju proizvoda (van der Valk et al., 2010). Kako bi se prevladali nedostaci uporabe seruma, pristupilo se oblikovanju medija bez seruma kao i formuliranju potpuno kemijski definiranih medija. Prednosti proizvodnje u uvjetima bez seruma poput smanjenja varijabilnosti sastava medija za uzgoj, eliminacija potencijalnih izvora biološkog zagađenja te pojednostavljen postupak pročišćavanja proizvoda od važnosti su za biofarmaceutsku proizvodnju. No, mediji bez seruma su općenito specifičniji i skuplji nego oni sa serumom, pa ih je potrebno posebno razvijati za pojedine tipove stanica i pojedine proizvode (van der Valk i sur., 2004).

Razvoj medija bez seruma potaknuo je interes za primjenom hidrolizata proteina dobivenih iz tkiva životinja, mlijeka, kvasca te biljaka poput soje, pšenice, riže i graška (Farges-Haddani i sur., 2006). Njihovim dodatkom nadomještaju se proteini uobičajeno sadržani u serumu, a kako regulatorni zahtjevi nalažu uklanjanje tvari animalnog porijekla iz medija za uzgoj stanica, prednost u primjeni imaju biljni hidrolizati. Hidrolizati proteina dobivaju se enzimskom, kiselinskom ili mikrobnom hidrolizom biološkog materijala, a sadrže različite hranjive tvari kao što su aminokiseline, oligopeptidi, lipidi, elementi u tragovima, vitamini i minerali te ostale spojeve koji potiču proliferaciju i utječu na povećanje aktivnosti stanica (Franek i sur., 2000; Sung i sur., 2004).

Posljednjih nekoliko desetljeća prisutan je porast korištenja organskih ostataka nakon prerade proizvoda iz različitih sektora poljoprivrede i industrije. Dodavanje vrijednosti takvom materijalu potiče ekonomsku održivost prehrambene industrije te umanjuje rizike onečišćenja okoliša. Takvi nusproizvodi prehrambene industrije koji između ostalog sadrže i proteine, predstavljaju novu potencijalnu sirovinu s mogućom primjenom i za kulture životinjskih stanica. Veliki potencijal primjene imaju ostaci iz proizvodnje jestivog ulja tzv. uljne pogače koje zaostaju nakon ekstrakcije ulja i danas se uglavnom koriste kao stočna hrana ili gnojivo. Iz uljnih pogača se danas proizvode i proizvodi s dodanom vrijednošću kao što su aminokiseline, enzimi, organske kiseline, jednostanični proteini (SCP), biološki aktivni sekundarni metaboliti i sl. Pogača lana postala je poznata kao funkcionalna hrana zbog svog sastava koji uključuje alfa-linolensku kiselinu, lignane i polisaharide te pokazuje pozitivne učinke na prevenciju različitih bolesti. Pogača, sjemenke i sjemenno brašno konoplje predstavljaju izvrstan izvor prehranbenog ulja, vlakana i proteina.

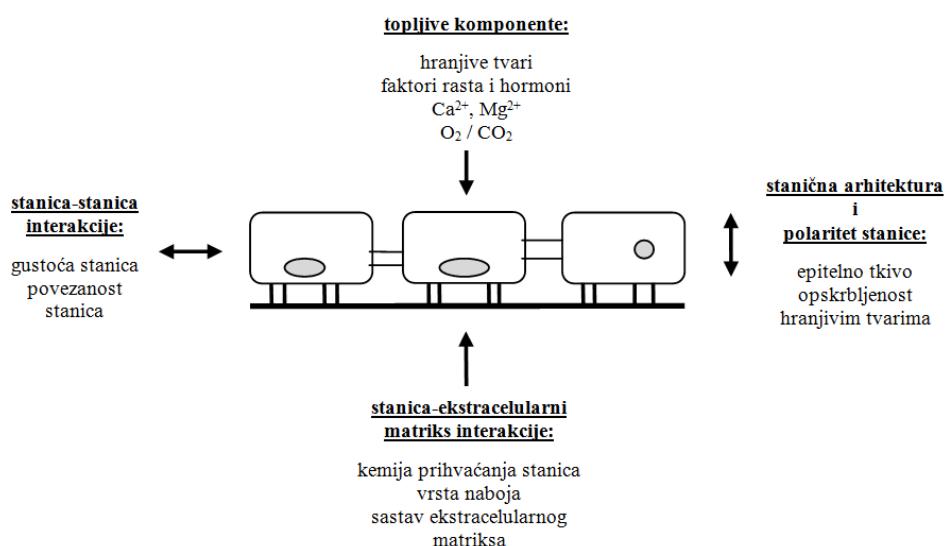
U literaturi su opisani postupci priprave i karakterizacije proteinskih izolata i hidrolizata iz pogače uljane repice (Chabanon i sur., 2007) te je određen njihov učinak na proliferaciju CHO stanica te prinos i kvalitetu rekombinatnog proizvoda. Međutim, priprava i karakterizacija proteinskih izolata i hidrolizata iz uljnih pogača lana i konoplje kao i njihov mogući učinak na proliferaciju i proizvodnost staničnih linija životinjskih stanica do sada nije temeljito istražen.

Na temelju svega navedenog cilj ovog rada bio je izolirati i karakterizirati proteinsku komponentu (izolat) iz pogača lana i konoplje te ispitati kako različite koncentracije izolata utječu na proliferaciju HEK 293T stanične linije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Medij za uzgoj stanica

Za uspješan rast, održavanje i ekspresiju diferenciranih metaboličkih funkcija *in vitro*, bilo da se radi o ljudskim ili životinjskim stanicama, primarnoj kulturi ili kontinuiranoj staničnoj liniji, potrebno je održavati odgovarajuće uvjete uzgoja kao što su temperatura, pH, osmolarnost i koncentracija kisika, a koji oponašaju fiziološke uvjete *in vivo*. Zbog toga se u *in vitro* uvjetima mora osigurati mikrokoliš koji omogućuje optimalan rast kulture stanica i tkiva. Kako bi rast stanica bio što bolji potrebno je osigurati podlogu koja omogućuje prihvaćanje i rast stanica te medij za uzgoj koji sadrži hranjive tvari, soli, hormone, faktore rasta kao što je prikazano na slici 1 (Lindl i Gstraunthaler, 2008).



Slika 1. Parametri koji utječu na rast, proliferaciju i ekspresiju diferenciranih funkcija u kulturi stanica *in vitro* (Lindl i Gstraunthaler, 2008).

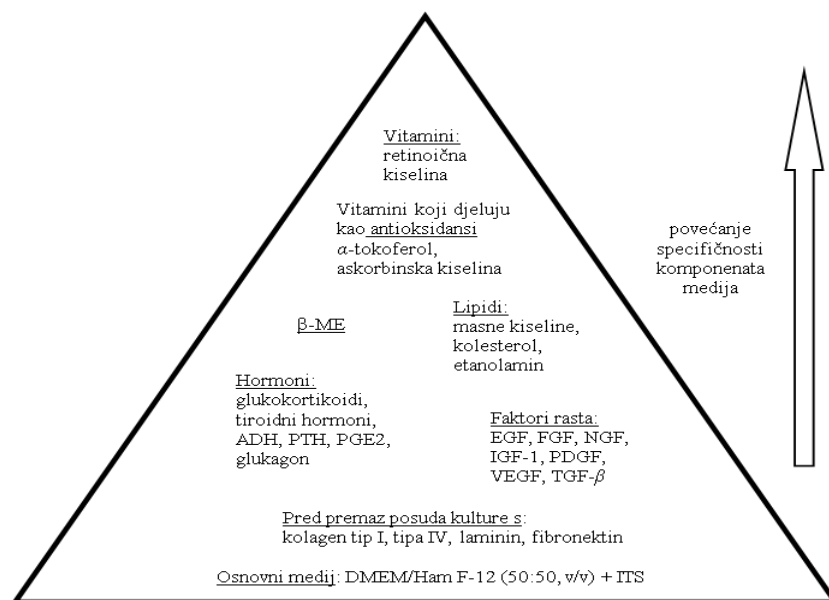
Medij za uzgoj stanica ima veliki značaj za kulturu stanica i tkiva, a sadrži hranjive tvari potrebne za rast, metabolizam i proliferaciju stanica. Osim navedenog, medij sadrži i biosintetske prekursore potrebne za odvijanje niza metaboličkih puteva sinteze složenih molekula tj. anabolizam, odnosno kataboličke supstrate koji se razgrađuju i osiguravaju stanicama energiju. Medij sadrži i vitamine i elemente u tragovima, koji imaju katalitičku funkciju te anorganske ione (elektrolite) s katalitičkim i fiziološkim djelovanjem kao što je npr. održavanje pH i osmolarnosti.

U cilju održavanja stanica živima kroz duži vremenski periodi i kako bi se odvijala proliferacija, migracija i diferencijacija stanica, osnovnom mediju moraju se dodati još neke komponente koje to pospješuju. U tu se svrhu najčešće koriste serum i animalnog porijekla, a standard među serumima je fetalni goveđi serum (*Fetal Bovine Serum*, FBS) koji se najčešće koristi za uzgoj životinjskih stanica. FBS je kompleksna mješavina velikog broja različitih komponenti poput faktora rasta, proteina, vitamina, elemenata u tragovima i hormona, a koji su esencijalni za rast i održavanje stanica. Tijekom zadnjih desetljeća, uočeni su ozbiljni rizici vezani uz korištenje sastojaka životinjskog ili humanog porijekla u proizvodnji terapeutika, a uglavnom su povezani s prijenosom infektivnih supstancija poput virusa i priona te otežanu izolaciju proizvoda (van der Valk i sur., 2010). Naime, serum koji se koristi u proizvodnji biofarmaceutika su zapravo nedefinirane smjese seruma individualnih donora, te njihov sastav varira od šarže do šarže. Posljedično, proizvodi ekstrahirani iz različitih smjesa seruma također su heterogeni. Ova varijabilnost zahtijeva dodatne stupnjeve osiguranja kvalitete u proizvodnom procesu, što negativno utječe na produktivnost i troškove proizvodnje.

2.1.1. Razvoj medija bez seruma

Kako bi se uklonio serum iz osnovnog medija i pri tome zadržala adhezija, rast i proliferacija stanica, potrebno je u razvoj medija bez dodatka seruma uključiti velik broj komponenata. Shema postupka zamjene seruma potrebnim sastojcima prikazana je na slici 2. Na početku uzgoja (dno piramide) nalazi se osnovni medij koji sadrži DMEM/Ham F-12 medij (50:50 v/v) obogaćen dodatkom inzulina, transferina i selen (ITS). U ovoj fazi razvoja u obzir treba uzeti i dodavanje faktora koji omogućuju prihvaćanje stanica na površinu posude u kojoj se uzgajaju. Sljedeći korak u prelasku na medij bez dodatka seruma je dodavanje specifičnih hormona i faktora rasta, jer se u serumu ti spojevi prirodno nalaze u različitim koncentracijama. U većini medija potreban je dodatak glukokortikoida i epidermalnog faktora rasta, dok se ostali

hormoni dodaju ovisno o specifičnim potrebama stanica (npr. nervni faktor rasta za neurone). Vrh piramide predstavlja povećanu specifičnost sastava medija bez seruma: dodatak lipida, antioksidansa i vitamina. Vitamin A (retinol) potreban je za kulturu raznih epitelnih stanica, a vitamin E (α -tokoferol), vitamin C (askorbat), β -merkaptetoetanol i selen važni su antioksidansi (van der Valk i sur., 2010). Ovaj tip piramide pokazuje kako se povećava specifičnost u dodavanju komponenata bazalnom mediju za uzgoj stanica.



Slika 2. Shematski prikaz razvoja medija bez dodatka seruma (preuzeto iz van der Valk i sur., 2010)

2.1.2. Hidrolizati proteina kao sastojci medija bez seruma

Upotreba medija bez seruma, proteina ili kemijski definiranih medija ima ograničenu primjenu zbog:

- određenih komponenti koje mogu imati negativan utjecaj na stanice,
- produženog vremena prihvatanja stanica za podlogu,
- povećanja rizika od proteolitičke razgradnje zbog nedostatka inhibitora proteaza prisutnih u serumu,
- smanjenja specifične brzine rasta i produktivnosti stanica (Sung i sur., 2004).

Kako bi se prevladali ovi nedostaci, u medijima bez seruma često se dodaju hidrolizati proteina, a posebice oni biljnog podrijetla. Hidrolizati proteina dobivaju se enzimskom, kiselinskom ili mikrobnom hidrolizom biološkog materijala izoliranog iz tkiva životinja, biljaka, mikroorganizama ili mliječnih proizvoda koji su bogati različitim hranjivim tvarima, kao što su aminokiseline, oligopeptidi, lipidi, elementi u tragovima, vitamini i minerali te tvarima koje potiču proliferaciju i utječu na povećanje aktivnosti stanica (Franek i sur., 2000; Sung i sur., 2004). U početku su se hidrolizati proteina koristili kao dodatni izvor dušika u mediju za uzgoj, dok danas imaju široku primjenu u različitim područjima biotehnologije te se primjenjuju u:

- kulturama životinjskih stanica za proizvodnju monoklonskih protutijela, terapijskih proteina i enzima,
- kulturama biljaka i insekata za dobivanje različitih proizvoda,
- posebnim medijima za rast i ekspresiju gena genetički modificiranih mikroorganizama,
- proizvodnji terapijskih lijekova i cjepiva,
- stočnoj hrani kako bi prinos mlijeka bio veći, za dobivanje kvalitetnijeg mesa te za povećanje tjelesne mase u što kraćem vremenu,
- za povećanje prinosa i produktivnosti usjeva (Pasupuleti i Demain, 2010).

Navedene primjene hidrolizata proteina zahtijevaju hidrolizate visoke kvalitete za razliku od „sirovih“ preparata koji su se prije upotrebljavali. Kako bi se zadovoljila potreba za visoko kvalitetnim hidrolizatima proteina, industrija je započela s proizvodnjom nutritivno visoko vrijednih hidrolizata koji sadrže di-, tri-, oligopeptide i aminokiseline, a koji utječu na fiziološku funkciju stanica i time povećavaju produktivnost i poboljšavaju fermentacijske sposobnosti kulture stanica. Zbog niže cijene i veće sigurnosti primjene tj. smanjene mogućnosti kontaminacije, kao potencijalni aktivatori rasta stanica sve se više koriste hidrolizati proteina mikrobnog (npr. kvasčev hidrolizat), biljnog (npr. hidrolizat soje, pšeničnog glutena, riže, uljane repice) ili životinjskog podrijetla (npr. Primatone™ RL) (Pasupuleti i Demain, 2010).

Ovisno o koncentracijama i podrijetlu, hidrolizati proteina mogu imati pozitivan ili negativan utjecaj na rast, proliferaciju i diferencijaciju stanica te na sintezu različitih proizvoda. Tako je medij bez dodatka seruma, ali s dodatkom hidrolizata proteina soje pokazao pozitivan utjecaj na rast i vijabilnost stanica CHO (Chun i sur., 2007), dok je dodatak peptidnih frakcija

hidrolizata uljane repice pokazao pozitivan učinak na rast stanica CHO i produktivnost rekombinantnog interferona (Farges-Haddani i sur., 2006). S druge pak strane, vrlo visoke koncentracije hidrolizata proteina mogu imati inhibitoran utjecaj na rast stanica jer se pretpostavlja da dolazi do narušavanja ravnoteže hranjivih tvari u mediju zbog vrlo visoke koncentracije aminokiselina i oligopeptida (Chun i sur., 2007).

2.2. Uljne pogače i njihova primjena u biotehnologiji

Uljne pogače su nusproizvodi koji nastaju pri prešanju sjemena uljarica kao što su suncokret, uljana repica, lan i konoplja. Pogače se koriste za ishranu životinja poput svinja, peradi i riba, a sadrže niz vrijednih sastojaka od kojih su najvažniji proteini. Uz lipidne tvari u sastav pogače ulaze celuloza, mineralne tvari i proteini. Sadržaj proteina daje nutritivnu vrijednost pogači pa se stoga pogače koriste izravno kao krmiva za ishranu životinja ili pak za pripremu krmnih smjesa. Uljne pogače možemo podijeliti na dvije skupine: jestive i nejestive. Jestive uljne pogače imaju visoku nutritivnu vrijednost pri čemu sadržaj proteina može varirati između 15 i 50%. Njihov sastav ovisi o vrsti, načinu uzgoja uljarice te procesu kojim su dobivene. Zbog visokog sadržaja proteina koriste se kao hrana za životinje, posebice kod riba i preživača (Ramachandran i sur., 2006). Nejestive uljne pogače poput onih dobivenih iz biljke *Neem* ili *Karanja* se zbog visokog udjela dušika, fosfora i kalija koriste kao organska dušična gnojiva. Neki od uljnih pogača se koriste kako bi se povećao unos dušika u biljku te kako bi se smanjila nitrifikacija tla. Također, provedeno je istraživanje utjecaja nejestivih uljnih pogača na insekticide i nametnike u tlu. Naime, to može biti od iznimne važnosti prilikom uzgoja hrane na tlu koje je sklono infekcijama ili bolestima koje mogu uništiti usjeve (Ramachandran i sur., 2006).

Najpoznatije uljne pogače koje su našle svoju primjenu u biotehnologiji su: kokosova pogača, pogača uljane repice, pogača suncokreta, sezamova pogača, pogača soje, pogača masline, te pogače lana i konoplje. Kokosova pogača se koristi najviše pri proizvodnji enzima i to lipaze pri čemu služi kao supstrat za rast organizama iz porodice gljiva. Ova pogača sadrži visoke koncentracije ugljika i dušika koji važni sastojci za rast prilikom uzgoja gljiva. Osim kokosove pogače, u proizvodnji enzima fitaze, amilaze, glukoamilaze te proteaze koriste se još sezamova pogača te pogača masline. U proizvodnji antibiotika, uljne pogače se koriste zbog povećanja prinosa na kraju samog procesa proizvodnje, ali i radi boljeg iskorištenja procesa. Tako npr. korištenjem pogače suncokreta možemo dobiti veće koncentracije klavulanske

kiseline ili cefamicina c prilikom proizvodnje u velikom mjerilu. Kada se radi o proizvodnji drugih kemikalija, najzanimljivije je dobivanje snažnih antioksidacijskih spojeva poput glukozida i to procesom fermentacije sezamove pogače pomoću mikroorganizma *Bacillus circulans*. (Ramachandran i sur., 2006).

Kao dodaci prehrani, uljne pogače se preporučuju zbog visokog udjela proteina, vlakana i masnih kiselina. Pogače se koriste za ishranu životinja poput svinja, peradi i riba pri čemu poboljšavaju metabolizam i opće stanje tretiranih životinja. Također su provedena istraživanja gdje su uljne pogače korištene kao izvor energije zbog dobrog omjera C:N i to u fermentorima pri mezofilnom procesu proizvodnje bioplina. Ulje dobiveno iz sezamove pogače može služiti kao obnovljivi izvor energije pa tako sporom pirolizom pogače suncokreta možemo dobiti gorivo sličnih svojstava koja se koriste danas za pogon automobila i strojeva u industriji. Novija poznata primjena u biotehnologiji je i upotreba uljnih pogača kao biokontrolnih agenasa. Pod pojmom biokontrolni agensi smatra se upotreba mikroorganizama za suzbijanje bolesti čime se nastoji poboljšati cjelokupno zdravlje biljke. Omogućavanje da se mikroorganizmima kolonizira korijenje biljaka domaćina predstavlja ekološku alternativu skupim pesticidima u borbi protiv korova, kao i protiv gljivičnih i bakterijskih infekcija. Bakterije koje potiču rast biljaka su autohtone u tlu te stoga imaju važnu ulogu u biokontroli biljnih patogena. Isto tako mogu suzbiti široki spektar bolesti uzrokovane bakterijama, gljivicama i nematodama. (Varvodić, 2015.)

2.2.1. Važnost proizvodnje i sastav lana

Lan je jednogodišnja biljka iz obitelji *Linaceae* koja uključuje deset rodova i više od 150 vrsta. Raste do visine od 0,3 do 1 metra te se uzgaja za proizvodnju tekstilnih vlakana i ulja. Sorte lana koje se koriste za proizvodnju tekstilnih vlakana obično imaju dužu stabljiku, 80-120 cm visoku i manje sjeme. Sorte koje se koriste za dobivanje ulja imaju kraće i jako razgranate stabljike, 60-80 cm visoke i veći broj sjemenki. Istraživanja su pokazala da je za rast i razvoj lana najpogodnije plodno tlo fine teksture i ilovačka tla (pijesak, mulj i glina).

Prije više od 60 godina, prosječna svjetska proizvodnja lana je bila oko 3,4 mil. tona, što je bilo više od suncokreta (2,5 mil. t) i nešto manje od uljane repice (3,8 mil. t). Od tada, svjetska proizvodnja lana varira između 2 i 3 mil. t dok je proizvodnja ostalih uljarica znatno porasla.

Laneno sjeme pa tako i lanena pogača su najveći izvor lignana. Osim lignana, lan je važan izvor fenolnih kiselina čija se važnost očituje u njihovoj biološkoj aktivnosti kao što su npr. antioksidacijsko, antimikrobno i antikancerogeno djelovanje. Osim lignana i fenolnih kiselina, laneno sjeme je važan izvor minerala i masnih kiselina. Najzastupljeniji minerali u sjemenkama lana su: kalcij, mangan, fosfor i kalij pri čemu se koncentracija kalcija kreće od 3,3-3,8 mg g⁻¹, mangana od 4,8-5,9 mg g⁻¹, fosfora od 6,4-8,2 mg g⁻¹ te kalija od 9,0-10,1 mg g⁻¹. Što se tiče masnih kiselina, najzastupljenija je linolenska sa udjelom od 58,5-59,7% a slijede je linolna sa 15,8-16,9% i oleinska sa 15,0-15,6%. Osim za ekstrakciju lignana, minerala i masnih kiselina, iz pogače lana se mogu izolirati proteini i polisaharidi. Odmašćena pogača se centrifugira te se iz tekućeg dijela dobivaju proteini, a iz krutog polisaharidi. Udio proteina iznosi 27,3%, a polisaharida 10,7%. Kao i mnoga druga ulja, laneno ulje ima visoki sadržaj globulina, 18,6%, i sadrži protein sličan albuminu koji čini 17,7% ukupnog proteina. Proteini iz lana su relativno bogati argininom, asparaginskom kiselinom i glutaminskom kiselinom, a sadrži manje količine lizina, metionina i cisteina. (Ćapin, 2016.)

Druga važna komponenta pogače lana su pektini. Dobivaju se vodenom ekstrakcijom, a njihov sastav predstavlja heterogenu smjesu polisaharida koji se sastoje od ksiloze, glukoze, galaktoze, arabinoze, ramnoze, fukoze i galakturonske kiseline (75% neutralne i 2 kiselinske frakcije). Raspon polisaharida koji se može ekstrahirati iz lanenog sjemena izazvao je veliko zanimanje, ne samo zbog očitih zdravstvenih prednosti zbog sadržaja topljivih vlakana, već i zbog potencijalne primjene lanenog sjemena kao funkcionalne hrane, iskorištavanjem njegovih fizikalnih svojstava kao zgušnjivača i emulgatora. Također, neki oligosaharidi i polisaharidi su opisani kao aditivi za hranu s antimikrobnim svojstvima, djelotvorni protiv patogenih bakterija i gljiva. Grupa oligosaharida s antimikrobnim učincima su tzv. hito-oligosaharidi koji ujedno posjeduju antitumorska i antioksidacijska svojstva te sposobnost hvatanja slobodnih radikala. Još jedna zanimljiva značajka ovih polisaharida je da potiču rast i razvoj gastrointestinalne mikroflore, pri čemu se opisuje probiotički učinak. Tako su npr. galaktooligosaharidi, fruktooligosaharidi i ciklodekstrini poznati su kao prebiotičke tvari. (Ćapin, 2016.)

2.2.2.1. Pogača lana

Pogača lana je nusproizvod, odnosno kruti ostatak nakon prešanja sjemenki lana koji se donedavno uglavnom smatrao otpadom i beskorisnim ostatkom. Danas privlači interes industrije i znanstvene zajednice jer se može koristiti kao obnovljivi izvor energije te kao sirovinska osnova za izolaciju proteina, vlakana i ostalih bioaktivnih komponenti. Nakon ekstrakcije ulja (s prinosom od približno 30%) ostaje velika količina prešane pogače lana, koja se odbacuje i još uvijek se smatra otpadom, ili u najboljem slučaju nusproizvodom. Pogača lana se uglavnom koristi kao stočna hrana, kao aditiv u pekarskim proizvodima (Gutierrez i sur.,2010), a ima i potencijal za primjenu u prehrani ljudi.

Tablica 1. Kemijski sastav pogače lana (Gutierrez i sur., 2010.)

Komponente pogače lana	%
Vlaga	8,30
Proteini	21,34
Lipidi	43,90
Vlakna	6,21
Pepeo	2,66
Ekstrakt (bez prisustva dušika)	17,59

2.2.2. Važnost proizvodnje i sastav konoplje

Konoplja (*Cannabis sativa* L.) predstavlja važan izvor prehrane već tisućama godina u kulturama starog svijeta. Vrste kanabisa koje se ne koriste kao lijek, obično se nazivaju konopljom i posljednjih godina njihov nutritivni potencijal nije se značajno proučavao niti se pretjerano koristi u industrijskim procesima 20. stoljeća. Tehnički, konoplja obično sadrži više od 30% ulja i oko 25% proteina, s znatnim količinama dijetalnih vlakana, vitamina i minerala. Ulje konoplje sadrži više od 80% polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) i izuzetno je bogat izvor dvije linoleinske kiseline (18: 2 *omega*- 6) i *alfa*-linolenske kiseline (18: 3 *omega*- 3). Omjer *Omega* 6 /*omega*-3 (n6 / n3) u ulju konoplje obično je između 2: 1 i 3: 1, što se smatra optimalnim za ljudsko zdravlje. Također, prisutni su i biološki metaboliti dvije esencijale masne kiseline, *gama*- linolenske kiseline (18: 3 *omega*- 6; 'GLA') i stearidonske kiseline (18: 4 *omega*- 3; 'SDA'). Dva glavna proteina u konoplji su edestin i albumin. Oba su visokokvalitetni proteini, lako se probavljaju i sadrže nutritivno značajne količine svih esencijalnih aminokiselina. Osim toga, konoplja sadrži iznimno visoke količine aminokiselina arginina i najčešće se koristi za liječenje različitih poremećaja ali i u tradicionalnoj orijentalnoj medicini. Nedavna klinička ispitivanja identificirala su konopljinu ulje kao funkcionalnu hranu, a istraživanja vezana za ishranu životinja pokazala su brojne prednosti konoplje kao dodatka prehrani (Callaway,2004)

Sjeme konoplje, usitnjeno ili cjelovito, vrlo je važno u tradicionalnoj azijskoj hrani i lijekovima. U Sjevernoj Americi, sjeme konoplje koristi se u industriji boja i lakova te se uvozi kao hrana za ptice. U proteklih 10 godina, konoplja se legalno koristi kao hrana za ljude u Kanadi i Sjedinjenim Američkim Državama, ali uzgoj konoplje i dalje nije legalan u većini država svijeta (Callaway,2004).

Nedavna dostupnost i uporaba ulja konoplje u Europi i Sjevernoj Americi potaknula je priče o poboljšanju zdravlja, liječenju akutnih i kroničnih stanja te brzog izliječenja jednostavnih rezova i opekotina, raznih kožnih problema, alergijskih reakcija i upalnih bolesti te čak i gripe. Većina, ako ne i svih, ovih tvrdnji može se povezati s jedinstvenim profilom masnih kiselina ulja konoplje i njegovog izravnog utjecaja na metabolizam esencijalnih masnih kiselina (EFA) te eikozanoida, koji uključuju prostaglandine i druge važne metabolite. Stoga, dodatak ulja koja sadrže visoku razinu EFA i drugih polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) u prehranu se može koristiti za poboljšanje ljudskog zdravlja, osobito ukoliko se ne unose u dovoljnim količinama u organizam putem hrane. PUFA su također izravno uklopljeni kao

fosfolipidi u staničnim i organelnim membranama. Ugrađivanje PUFA-a u membranski fosfolipidni dvosloj neophodno je za održavanje fluidnosti stanične membrane, naročito kod formiranja neuronskih membrana unutar središnjeg živčanog sustava. PUFA i njihovi biološki metaboliti mogu pozitivno utjecati na profil masnih kiselina u lipoproteinima male gustoće (LDL) , koji su snažno povezani s kroničnom bolesti srca. Dakle, hrana koja ima dovoljnu razinu PUFA-e može smanjiti i razine LDL-kolesterola i krvnog tlaka kod ljudi. PUFA također smanjuje agregaciju trombocita, što rezultira smanjenjem perifernog krvnog tlaka i stvaranje ugruška. (Callaway,2004)

Albumin, globulin, edestin,i legumin su glavni proteini u sjemenu konoplje te su bogati aminokiselinama važnim održavanje ljudskog zdravlja. Izravna usporedba sastava proteina aminokiselina iz bjelanjka, sjemenke konoplje i soje pokazuje da su proteini konoplje usporedivi s drugim visokokvalitetnim proteinima (Tablica 2).

Proteini konoplje imaju velike količine aminokiselina koje sadrže sumpor-metionin i cistein, kao i visoku razinu arginina i glutaminske kiseline. Brašno konoplje bogati je izvor proteina i polinezasićenih masnih kiselina i uz to sadrži značajne količine vitamina i korisnih minerala.

Tablica 2. Kemijski sastav pogače konoplje (Callaway, 2004)

Komponente	sjeme konoplje (%)	pogača konoplje (%)
Ulje	35,5	11,1
Protein	24,8	33,5
Ugljikohidrati	27,6	42,6
Vlažnost	6,5	5,6
Pepeo	5,6	7,2
Energija (kJ/100g)	2200	1700
Ukupna vlakna	27,6	42,6
Probavljiva vlakna	5,4	16,4
Neprobavljiva vlakna	22,2	26,2

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Za pripravu proteinskih izolata tijekom ovog istraživanja korišteni su brašno odmašćene pogače lana i konoplje ustupljeno od strane OPG Janković (www.opg-jankovic.com).

3.1.1. Kemikalije

Fetalni teleći serum (FBS), Gibco BRL, SAD

Trypsin-EDTA, Sigma, St. Louis, SAD

Trypan-plavo, Sigma, St. Louis, SAD

Natrijev hidroksid, Kemika, Hrvatska

Natrijev karbonat, Kemika, Hrvatska

Bakrov sulfat pentahidrat, Kemika, Hrvatska

Kalij natrij tetrahidrat, Kemika, Hrvatska

Apsolutni etanol, Kemika, Hrvatska

β -merkaptoetanol, LKB, Bromma, Švedska

Bromfenol plavo, Kemika, Zagreb, RH

Coomassie plavo, Sigma, St. Louis, SAD

EDTA (Kompleksal III), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Glicin, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Octena kiselina, Kemika, Zagreb

Klorovodična kiselina, Kemika, Zagreb

Glicerol, Kemika, Zagreb

Metanol, Kemika, Zagreb

TEMED (*N,N,N,N'*-tetrametiletilendiamin), LKB, Bromma, Švedska

Smjesa standardnih proteina niskih molarnih masa (LMW Calibration Kit), GE Healthcare, SAD

TRIS [Tris(hidroksimetil)aminometan], Kemika, Zagreb, Hrvatska

SDS (natrijev dodecilsulfat), LKB, Bromma, Švedska

Folin-Ciocalteu-ov reagens, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Akrlamid, Sigma, St. Louis, SAD

Bisakrlamid (*N,N'*-metilenbisakrlamid), Fluka, Buchs, Švicarska

Amonijev persulfat, LKB, Bromma, Švedska

Sve kemikalije upotrijebljene u ovom radu bile su p.a., a voda korištena za pripravu otopina i pufera bila je destilirana, demineralizirana ili mili Q voda.

3.1.2. Otopine

1 M NaOH

Natrijev hidroksid	20 g
Destilirana voda	do 500 mL

1 M HCl

Klorovodična kiselina(37 % w/w)	41,75 ml
Destilirana voda	do 500 mL

Reagens A

Natrijev hidroksid	2 g
Natrijev karbonat	10 g
Destilirana voda	do 500 mL

Reagens B1

Bakrov sulfat pentahidrat	1 g
Destilirana voda	do 100 mL

Reagens B2

Kalij natrij tartarat	2 g
Destilirana voda	do 100 mL

Reagens C

Reagens A	50 ml
Reagens B1	0,5 ml
Reagens B2	0,5 ml

PBS pufer (pH=7,4)

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,44 g
Kalijev dihidrogenfosfat	0,24 g
Destilirana voda	do 100 mL

0,4 % otopina tripan-plavo

Boja tripan plavo	0,04 g
PBS pufer	10,00 mL

Pufer za uzorke za SDS elektroforezu

2 mM EDTA III
2% (m/v) SDS
10% (v/v) glicerol
0,001% (v/v) bromfenol plavo
5% (v/v) β -merkaptioetanol
50 mM Tris-HCl pH=6,8

Gel za sabijanje

4,5% (m/v) akrilamid
0,12% (m/v) N, N' – metilenbisakrilamid
0,1% (m/v) SDS
0,075% (v/v) N, N, N', N'- tetrametiletilendiamin (TEMED)
7,5% (m/v) amonijev persulfat (APS)
0,5 M Tris-HCl pufer pH=6,8

Gel za razdvajanje (12 %)

12% (m/v) akrilamid
0,32% (m/v) N, N' – metilenbisakrilamid
0,066% (v/v) TEMED
0,086% (m/v) APS
0,5 M Tris-HCl pufer pH=8,8

Pufer za proteinsku elektroforezu

0,1% (m/v) SDS

25mM TRIS-glicin pufer pH=6,8

Coomassie otopina za bojanje gelova

0,25% Coomassie plavo boja

10 % ledena octena kiselina

50 % glicerol

destilirana voda

3.1.3. Uredaji i oprema

- inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Iskra PIO, Slovenija
- magnetska mješalica sa grijanjem, MM-510 TEHTNICA, Železniki, Slovenija
- centrifuga Beckman Model J-21B, Brea, Kalifornija
- komora za sterilni rad (*laminar flow cabinet*), Kambič, Slovenija
- inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- T - boce od 25 cm² i 50 cm², Corning, SAD
- ploče s jažicama, Corning, SAD
- laboratorijski pribor (pipete, nastavci za pipete, laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice, kivete, tarionik)
- laboratorijska vaga, Boeco, Njemačka
- Neubauerova komorica za brojanje stanica
- hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- hladnjak (-80 °C), TT 80 FRYKA, Njemačka
- spektrofotometar Thermo Scientific Genesys 10 S UV/VIS, SAD
- sistem za vertikalnu elektroforezu CVS10D, Clever Scientific Ltd., Rugby, Velika Britanija
- sustav napajanja za elektroforezu, Consort, Turnhout, Belgija
- sterilni filteri, Sigma, St. Louis, SAD

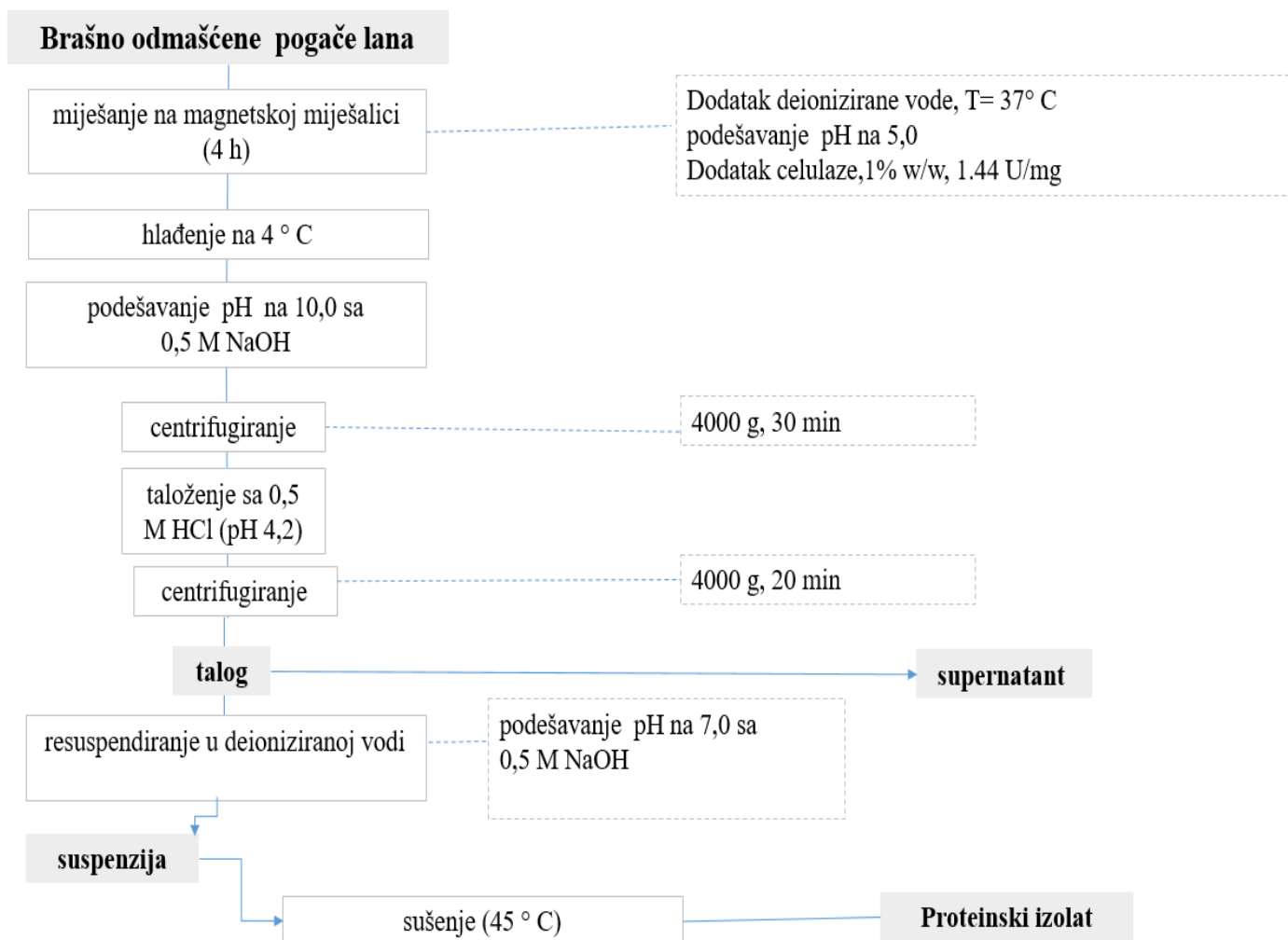
3.1.4. Stanična linija HEK 293T

U ovom radu korištena je humana stanična linija HEK 293T, dobivena iz radne banke stanica *American Type Culture Collection* (ATCC). HEK 293T stanice dobivene su transformacijom humanih embrionalnih stanica bubrega s DNA adenovirusom 5. Ranih 70-ih godina prošlog stoljeća, Alex Vander Eb je uzgojio staničnu liniju, dok je transformaciju izveo Frank Graham po čijoj metodi dobivaju ime. HEK je skraćenica engleskog naziva ove stanične linije (eng. Human Embryotic Kidney), dok 293 predstavlja redni broj eksperimenta kojim je nastala ova stanična linija. Stanice se često koriste jer se brzo i jednostavno umnažaju i održavaju, a daju se lako i transfektirati zbog čega se često se koriste u biološkim istraživanjima. Glavna primjena im je u proizvodnji egzogenih proteina ili virusa, za farmaceutsku i biomedicinsku namjenu te u raznim istraživanjima.

3.2. Metode rada

3.2.1. Priprava proteinskog izolata lana

Pri pripremi proteinskog izolata lana korištena je odmašćena pogača lana dobivena od strane OPG Janković. Odvagano je 75 g brašna koje je otopljeno u 1500 mL deionizirane vode (5 % w/v), nakon čega je pH vrijednost smjese podešena na 5,0 pomoću 1 M HCl te je smjesa zagrijana na 37 °C i ostavljena da se miješa na magnetskoj miješalici tijekom 4 sata. Smjesi je također dodan enzim celulaza u omjeru 1% w/w. Nakon 4 sata, smjesa je ohlađena na 4 °C i podešena joj je pH vrijednost na 10,0 pomoću 1 M NaOH. Nakon toga smjesa je centrifugirana pri 4000xg, tijekom 30 minuta na 20 °C pri čemu je izdvojen supernatant kojem je podešena pH vrijednosti na 4,2 pomoću 1 M HCl. Zatim je slijedilo još jedno centrifugiranje pri 4000xg, 10 minuta te je pritom odvojen talog koji je homogeniziran deioniziranom vodom i podešena mu je pH vrijednost na 7,0 dodatkom 1 M NaOH. Tako pripremljena suspenzija je ostavljena na sušenje pri 45 °C preko noći (slika 3.). Osušeni izolat je usitnjen u tarioniku, izvagan i spremljen u kivetu te ostavljen na 4 °C do korištenja.

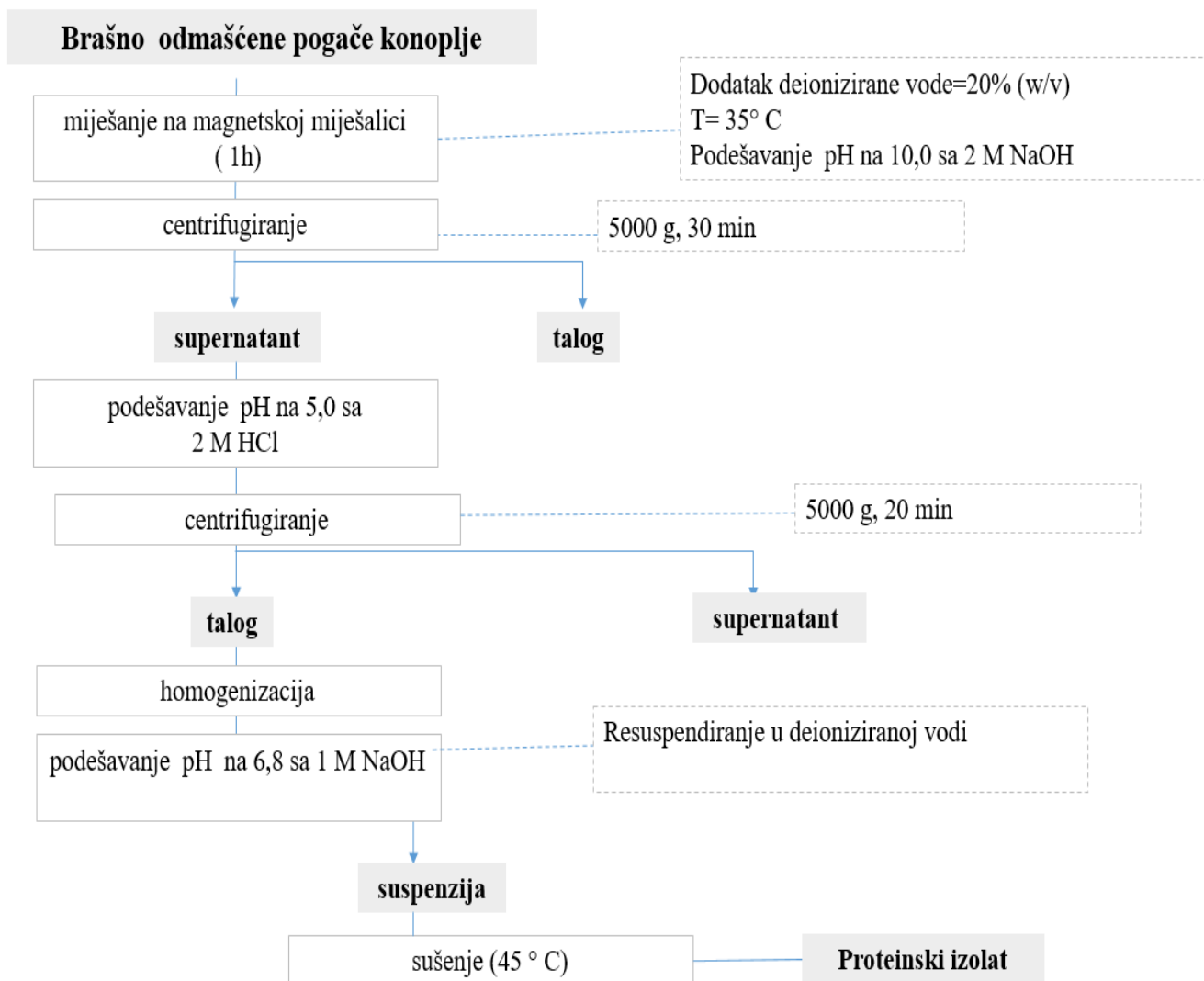


Slika 3. Shema priprave proteinskog izolata iz pogače lana

3.2.2. Priprava proteinskog izolata konoplje

Pri pripremi proteinskog izolata konoplje korištena je odmašćena pogača konoplje dobivena također od strane OPG Janković. Odvagano je 300 g brašna koje je otopljeno u 1500 mL deionizirane vode (20 % w/v), nakon čega je pH vrijednost smjese podešena na 10,0 pomoću 1 M NaOH te je smjesa zagrijana na 35 °C i ostavljena da se miješa na magnetskoj miješalici tijekom 1 sata. Nakon sat vremena, smjesa je centrifugirana pri 5000xg, tijekom 30 minuta na 20 °C pri čemu je izdvojen supernatant kojem je podešena pH vrijednosti na 5,0 pomoću 1 M HCl. Zatim je slijedilo još jedno centrifugiranje pri 5000xg, 20 minuta te je pritom odvojen talog koji je homogeniziran deioniziranom vodom i podešena mu je pH vrijednost na

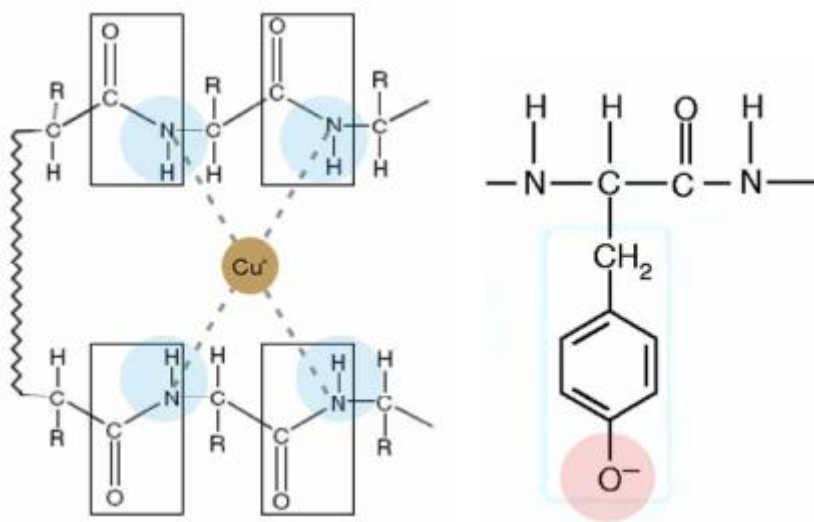
6,8 dodatkom 1 M NaOH. Tako pripremljena suspenzija je ostavljena na sušenje pri 45 °C preko noći (slika 4.). Osušeni izolat je usitnjen u tarioniku, izvagan i spremljen u kivetu te ostavljen na 4 °C do korištenja.



Slika 4. Shema priprave proteinskog izolata iz pogače konoplje

3.2.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u

Lowry metoda za određivanje koncentracije proteina se temelji na reakciji (a) bakrenih iona vezanih na amino skupine peptidne veze i (b) fenolne skupine bočnog ogranka aminokiseline Tyr u proteinu sa Folin-Ciocalteu reagensom, pri čemu nastaje kompleks plavo-ljubičastog obojenja sa apsorpcijskim maksimumom pri 740 nm (slika 5).



Slika 5. Princip određivanja koncentracije proteina Lowry metodom. Na slici lijevo je prikazana kovalentna veza iona bakra sa četiri dušikova atoma peptidne veze, a na slici desno hidroksilna skupina aminokiseline tirozin u proteinu

Bakreni ioni kovalentno vezani na amino skupine peptidne veze i fenolna skupina tirozina (Tyr) reduciraju fosfovolframatnu i fosfomolibdensku kiselinu Folinovog reagensa u volfram i molibden plavilo. Folin-Ciocalteu (Folinov) reagens sadrži fosfovolframatnu i fosfomolibdensku kiselinu koje bakreni ioni kovalentno vezani na amino skupine peptidne veze i fenolna skupina tirozina (Tyr) reduciraju u volfram i molibden plavilo.

Iz otopine BSA, $\gamma(\text{BSA}) = 1 \text{ mg/mL}$, pripremljeno je po 1 mL standardnog niza, kako bi se napravio baždarni dijagram, prikazano u tablici 3.

Tablica 3. Priprema standardnog niza razrjeđenja BSA

Uzorak	Koncentracija (mg/mL)	Volumen BSA (mL)	Volumen vode (mL)
S0	0,00	0	1,00
S1	0,01	0,01	0,99
S2	0,02	0,02	0,98
S3	0,04	0,04	0,96
S4	0,08	0,06	0,94
S5	0,10	0,10	0,90
S6	0,16	0,16	0,84
S7	0,20	0,20	0,80
S8	0,40	0,40	0,60

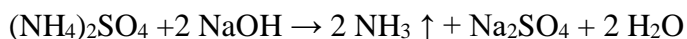
U epruvete se pipetira po 100 μ L otopina standardnog niza i uzorka (izolata iz pogača lana i konoplje) doda se 1 mL reagensa C, smjesa se promiješa na vortex miješalici i ostavi 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon 10 minuta, u svaku epruvetu naglo je dodano 100 μ L Folin-Ciocalteu reagensa na vortexu te je smjesa ostavljena 40 min na sobnoj temperaturi. Nakon termostatiranja očitana je apsorbancija standardnog niza kao i uzoraka proteinskih izolata pri valnoj duljini 740 nm, uz slijepu probu (S0).

3.2.4. Određivanje sadržaja proteina metodom po Kjeldahlu

Određivanje proteina metodom po Kjeldahlu temelji se na pretpostavci da svi proteini sadrže u prosjeku 16% dušika, pa se nakon razgradnje organske tvari određuje proteinski dušik izražen kao amonijak. Međutim, gotovo svi prirodni spojevi koji sadrže dušik reagiraju po ovoj metodi, pa je uporabljivost Kjeldahlove metode ograničena.

Kuhanjem uzorka s koncentriranom kiselinom provodi se tzv. „mokro spaljivanje“ kojim se organski dio razori u CO₂ i vodu, a dušik amino-skupine prelazi u amonijak koji s prisutnom kiselinom daje amonijev sulfat. Amonijak iz amonijevog sulfata oslobađa se kuhanjem s koncentriranom natrijevom lužinom, destilira i hvata u zasićenu otopinu borne kiseline. Amonijak se potom kvantificira titracijom s kloridnom kiselinom.

Organski spojevi s dušikom + $\text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 + \text{ostali nusprodukti}$



Amonijak, odnosno dušik kao produkt razgradnje proteina, određen titracijom koristi se za računanje mase proteina. Masa dušika pomnoži se s približnim empirijskim faktorom koji iznosi 6,25 i dobije se masa proteina u uzorku. Ovaj faktor računa se na temelju pretpostavke da u proteinima ima oko 16% dušika (inače udjel dušika u proteinima varira od 13 do 19%, ovisno o aminokiselinama od kojih su sastavljeni proteini).

Opis postupka određivanja proteina metodom po Kjeldahlu:

U Kjeldahlovu tikvicu odvaže se 1 g uzorka (odnosno 10 mL za tekuće uzorke) i doda se 1,5 mL sulfatne kiseline (koncentracije 1 mol/L) tako da se kiselinom ovlaži cijeli uzorak (u protivnom dolazi do gubitaka jer suhim spaljivanjem izlazi dušik u elementarnom obliku). Sadržaj tikvice upari se na plameniku preko azbestne mrežice i to tako da se u početku grije na slabom plamenu oko 5 minuta a zatim se plamen pojača da otopina dobro vrije. Nakon što reakcijska smjesa potamni, dodaje se katalizator (Kjeldahl-tablete) i 15 mL koncentrirane sulfatne kiseline te se nastavi zagrijavanje. Po završetku reakcije, otopina poprimi svijetlo zelenu boju te se uzorak kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Za destilaciju u aparaturi po Parnas-Wagneru (slika 6.) uzme se 10 mL tako razrijeđenog uzorka. Prije destilacije uzorak se zaluži natrijevim hidroksidom (koncentracije 500 g/L), kako bi se oslobodio vezani amonijak. Destilat se uvodi u Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL u kojoj se nalazi 10 mL otopine borne kiseline (koncentracije 40 g/L), pomiješane s nekoliko kapi indikatora metil-oranž. Destilacija se prekida kada se predestilira 40 mL uzorka. Destilat se zatim titrira s otopinom kloridne kiseline (koncentracije 0,01 mol/L) do pojave boje pokožice luka. Isti postupak se ponovi i sa slijepom probom, koja umjesto uzorka sadržava 10 mL destilirane vode.

Količina proteina izračuna se prema formuli:

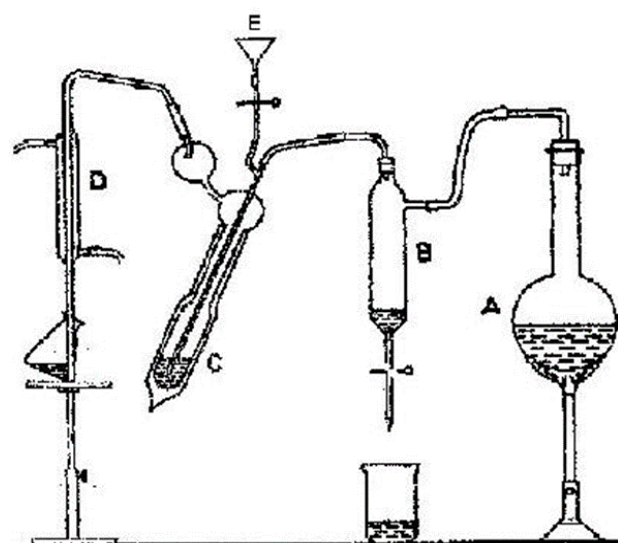
$$V = a - b \quad [1]$$

pri čemu je:

a = volumen utrošene HCl koncentracije 0,01 mol/L za titraciju uzorka [mL]

b = volumen utrošene HCl koncentracije 0,01 mol/L za titraciju slijepe probe [mL]

$$m(\text{proteina}) = c(\text{HCl}) \times V \times M(N) \times 10 \times 6,25 \text{ [g]} \quad [2]$$



- A – okrugla tikvica (služi za razvijanje vodene pare)
- B – recipijent-posuda za pražnjenje destilacijske posude
- C – destilacijska tikvica
- D - vodeno hladilo
- E – lijevak
- F - Erlenmeyer-ova tikvica

Slika 6 . Skica destilacijske aparature po Parnas-Wagneru (preuzeto iz skripte vježbi modula “Proizvodnja bioplina iz obnovljivih sirovina” na PBF-u)

3.2.5. SDS-PAGE elektroforeza proteinskih izolata iz pogača lana i konoplje

Proteinski izolati iz lana i konoplje razdvojeni su SDS-elektroforezom po Laemmli-ju (Laemmli, 1970). Uzorcima proteina dodano je 5 μL pufera za uzorke za elektroforezu po Laemmli-ju te su tretirani 2-3 minute u kipućoj vodenoj kupelji. Potom su uzorci i smjesa standardnih proteina male molarne mase nanieseni na prethodno pripremljenu 12%-tnu poliakrilamidnu ploču za elektroforezu. Elektroforeza je provedena u puferu za elektroforezu u aparatu za elektroforezu pri stalnom naponu od 200 V uz hlađenje etanolom pumpom. Tijek elektroforeze praćen je migracijom boje brom fenol plavo, a po završetku elektroforeze gel je skinut s ploče za elektroforezu i obojan Coomassie plavo otopinom za bojanje preko noći. Odbojavanje gelova provedeno je u otopini za odbojavanje u kojoj se gelovi i čuvaju.

3.2.6. Uzgoj HEK 293T stanica u T-bocama

Stanice se čuvaju u mediju za zamrzavanje na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, a smrzavaju se u koncentraciji od oko 1×10^7 stanica/mL. Ampula sa stanicama se prvo odmrzne naglim uranjanjem u vodenu kupelj na $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon odmrzavanja stanica slijedi centrifugiranje 3 minute na 1000 okretaja/min. Supernatant se ukloni, a zaostali talog stanica se resuspendira u 10 mL medija bez dodatka seruma. Stanice se potom prebace u T-bocu koja se stavlja u inkubator na $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ i u odgovarajuću atmosferu koja sadrži 95 % zraka i 5 % CO_2 . Brojnost stanica, njihovo opće stanje i morfologija se svakodnevno kontrolira inverznim mikroskopom. Prati se i boja medija, budući da njena nagla promjena ukazuje na pojavu kontaminacije.

3.2.7. Utjecaj dodatka izolata proteina na rast stanica i određivanje broja

stanica metodom tripan-plavo

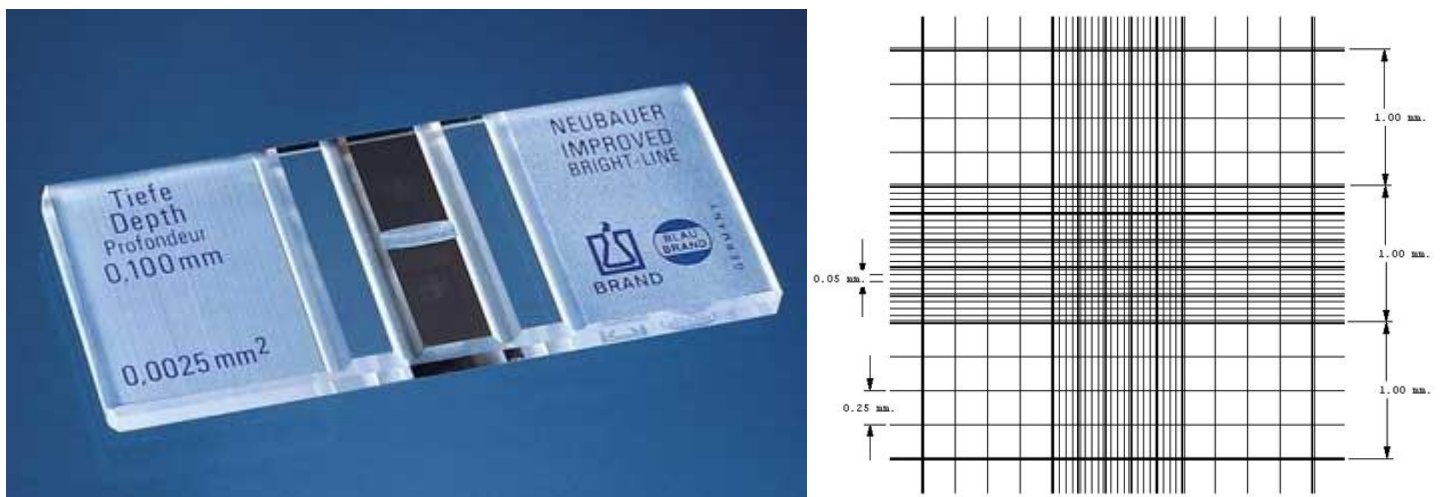
Stanice iz eksponencijalne faze rasta nacijepljene su u ploče s 12 jažica u početnoj koncentraciji od 2×10^3 st/mL u 1 mL medija za uzgoj te su dodani prethodno pripremljeni i sterilno profiltrirani proteinski izolati (koncentracija proteina 5 g/L). Dinamika rasta stanica praćena je tijekom 96 h brojanjem u Neubaerovoj komorici uz dodatak boje tripan-plavo. Tijekom uzgoja stanica uzimao se uzorak kako bi se odredio broj poraslih stanica. Budući da stanice rastu prihvaćene za dno jažica, najprije je potrebno ukloniti medij za uzgoj. Potom se na stanice dodaje 0,5 mL tripsina koji djeluje kroz desetak minuta, što je vrijeme potrebno da se stanice odvoje od površine na kojoj rastu. Zatim se dodaje 0,5 mL medija da se inhibira djelovanje tripsina i daljnje razaranja staničnih struktura. Učinak tripsina provjerava se pod inverznim mikroskopom kako bi bili sigurni da su se sve stanice odvojile od površine. Uzima se 10 μL uzorka stanica koji se pomiješa s 10 μL boje tripan-plavo i tako pripremljen uzorak se stavlja na Neubaerovoj komoricu za brojanje stanica. Komorica je podijeljena na 4 velika kvadrata, a u svakom velikom kvadratu nalazi se 16 malih kvadratića u kojima se broje stanice (slika 7.).

Pod mikroskopom se određuje broj živih stanica brojanjem u četiri središnja kvadrata komorice. Mrtve se stanice razlikuju od živih po tome što se zbog oštećene membrane boje plavo, dok se žive stanice ne oboje.

Broj živih stanica po mL suspenzije računa se na sljedeći način:

$$\text{Broj stanica/mL suspenzije} = X_{sr} \times \text{faktor razrjeđenja} \times 5 \times 10^3 \quad [3]$$

pri čemu je X_{sr} - srednja vrijednost broja stanica unutar 4 središnja kvadrata komorice.



Slika 7 . Neubaerova komorica za brojanje stanica (Anonymous 1 , 2017)

4. REZULTATI I RASPRAVA

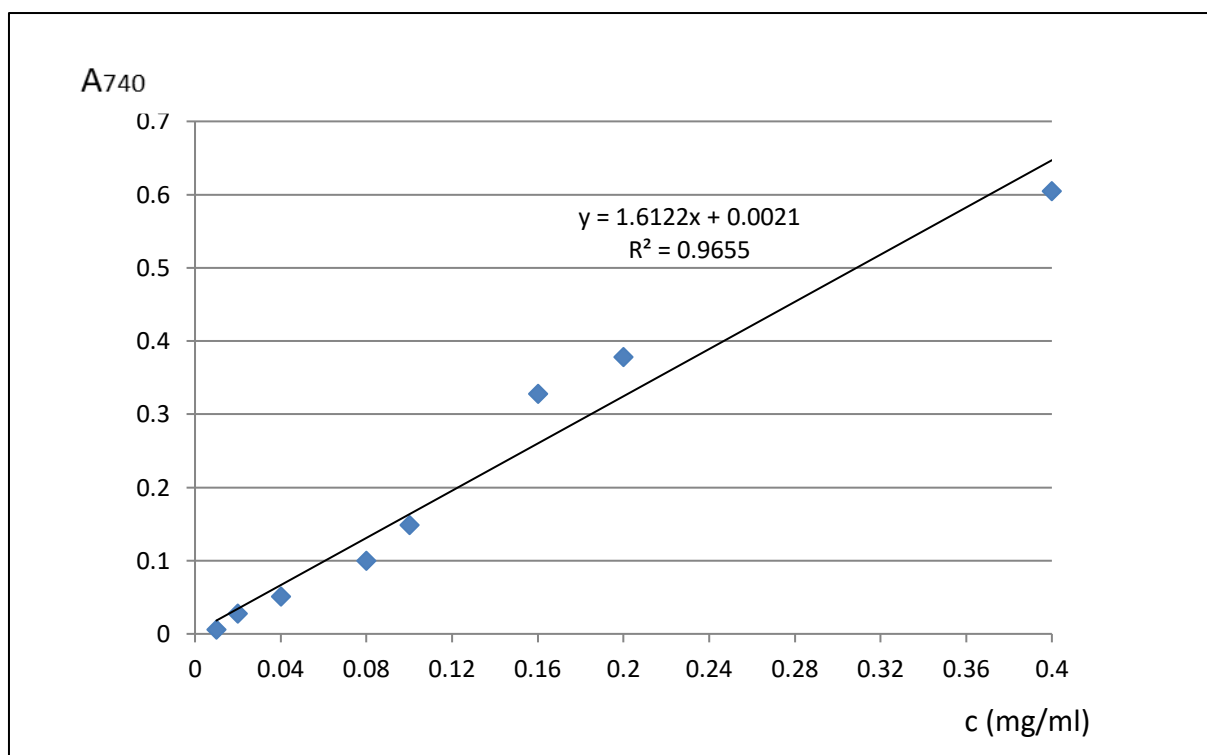
Proteinski hidrolizati dobiveni iz soje, riže i pšeničnog glutena već su niz godina prisutni na tržištu i koriste se za povećanje učinkovitosti procesa s mikrobnim i staničnim kulturama, čime ujedno doprinose povećanju iskorištenja ishodnog biljnog materijala. Porast konkurentnosti proizvodnje poglavito na tržištu prehrambenih proizvoda, povećao je interes proizvođača za boljim iskorištenjem izvornih sirovina kao i proizvedenog otpadnog materijala. Dodavanjem vrijednosti takvom materijalu potiče se ekonomska održivost prehrambene industrije te umanjuje rizike onečišćenja okoliša. Takvi nusproizvodi prehrambene industrije koji između ostalog sadrže i proteine, predstavljaju novu potencijalnu sirovinu s mogućom primjenom i za kulture životinjskih stanica. Veliki potencijal pritom imaju ostaci iz proizvodnje jestivog ulja tj. uljne pogače koje zaostaju nakon ekstrakcije ulja i danas se uglavnom koriste kao stočna hrana ili gnojivo. Prema izvješću Svjetske organizacije za hranu i poljoprivredu (www.fao.org) iz 2014., proizvodnja uljnih pogača je u stalnom porastu i dostiže godišnju proizvodnju od skoro 130 milijuna tona (više od 90% se iskoristi u daljnjoj obradi za različite namjene). Uz Kinu, EU je najveći uvoznik uljnih pogača što ukazuje na gospodarsku važnost ovog industrijskog nusproizvoda kao sirovine. Obzirom na porijeklo, najzastupljenije su pogače soje (57%), uljane repice (15%) i pamuka (10%). Uljne pogače ostalih vrsta uljarica, poput lana i konoplje zastupljene su manje od 10%.

U literaturi su opisani postupci pripreme i karakterizacije proteinskih hidrolizata iz pogače uljane repice (Chabanon i sur., 2007) te je određen njihov učinak na proliferaciju CHO stanica te prinos i kvalitetu rekombinatnog proizvoda (Chabanon i sur., 2008). Uljne pogače lana (*Linus usitatissimum*) i industrijske konoplje (*Cannabis sativa*) sadrže 30-35% proteina i kao takve nisu zanemariv izvor proteina za primjenu u tehnologiji životinjskih stanica. Međutim, priprema i karakterizacija proteinskih hidrolizata iz uljnih pogača lana i konoplje kao i njihov mogući učinak na proliferaciju i proizvodnost staničnih linija životinjskih stanica do sada nije temeljito istražen. S obzirom da uljna pogača lana sadrži 30-40% proteina (Mueller i sur., 2010), a uljna pogača konoplje oko 35% proteina (Callaway, 2004), proteini koji zaostaju u pogačama nakon ekstrakcije ili prešanja ulja zbog izbalansiranog sadržaja aminokiselina mogu se koristiti kao nadomjestak za dio seruma ili dodatak medijima bez seruma. S obzirom da pogače sadrže i tvari ne-proteinskog karaktera, one se moraju ukloniti kako bi se uklonilo i njihovo moguće nepoželjno biološko djelovanje na stanice (Franěk i sur. 2000). Da bi se optimizirala kvaliteta

hidrolizata, prije samog postupka hidrolize potrebno je izdvojiti proteinski izolat, a što je ujedno i prvi korak u pripravi hidrolizata te postavljeni cilj ovog diplomskog rada.

4.1. Priprava proteinskih izolata iz pogača lana i konoplje i određivanje sadržaja proteina

U ovom radu pripremljeni su proteinski izolati iz odmašćenih pogača lana i konoplje prema protokolu opisanom u poglavljima 3.2.1. i 3.2.2. i na slikama 3. i 4. Tijekom priprave izolata, dobiveni talozi proteinskih izolata su otopljeni u demineraliziranoj vodi i uzeti su uzorci koji su korišteni za određivanje proteina metodom po Lowryju. Kako bi se mogao odrediti sadržaj proteina u izolatima, najprije je napravljen baždarni dijagram s poznatima koncentracijama goveđeg albumina (BSA) (slika 8).



Slika 8. Baždarni dijagram za određivanje proteina po Lowryju

U tablici 4. prikazane su koncentracije proteina određene u pripremljenim izolatima i izražene u mg/mL te je izračunat i udio proteina izražen kao % s obzirom na početnu masu brašna pogača lana i konoplje.

Tablica 4. Koncentracije i udio proteina u izolatima pripremljenim iz pogača lana i konoplje određeni metodom po Lowryju

Proteinski izolat	Koncentracija proteina (mg/mL)		Udio proteina (% w/w)	
	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 1	Uzorak 2
Lan (FPI)	45,80	69,41	43,71	60,42
Konoplja (HPI)	50,71	70,64	27,72	48,12

Tijekom pripreme proteinskih izolata napravljena su dva odvojena pokusa u kojima je u izolatima lana dobiveno 45,8 mg/mL i 69,41 mg/mL proteina odnosno u izolatima konoplje dobiveno je 43,71 mg/mL i 60,42 mg/mL proteina. Guttierrez i suradnici (2010.) su također izolirali proteine iz lana kako bi dobili komponente koje se mogu dalje prerađivati i koristiti kao dodaci prehrani kod ljudi. Kao početni materijal koristili su smeđe laneno sjeme kojem su najprije pomoću preše uklonili lipidnu komponentu tj. ulje i u kojem je određen udio proteina od 21,34%. Također, u svom su istraživanju odredili početni udio sadržaja proteina i u pogači lana koji je iznosio 27,78%. Za usporedbu, Mueller i sur. (2010.) su u uljnoj pogači lana odredili 43,3% proteina, a što se objašnjava lošijom ekstrakcijom lipida čiji udio je iznosio 1,67% u usporedbi s 29,37% lipida koje su u svom uzorku odredili Guttierrez i sur. (2010.). S obzirom na početnu koncentraciju proteina u pogači lana, Guttierrez i sur. (2010) su dobili udio proteina od 53%, dok je u našem istraživanju u 2. uzorku dobiven udio od 60,4 %. Nadalje, tijekom pripreme proteinskih izolata iz pogača lana i konoplje, dobivene su različite koncentracije proteina uz korištenje istog početnog materijala. Razlog tomu je to što je brašno pogače lana i konoplje u ta dva puta uzeto iz različitih pakiranja pri čemu možemo zaključiti da je postojala razlika u obradi odmašćene pogače lana i konoplje u različitim vremenskim razdobljima i uvjetima.

Vezano za određivanje koncentracije proteina u izolatu iz pogače konoplje, Callaway (2004) navodi da udio proteina iznosi 33,5% dok su Pojić i sur. (2014) u svom istraživanju odredili udio od 27,4% proteina u uljnoj pogači konoplje. S druge pak strane Tang i sur. (2006) navode kako su u brašnu pogače konoplje odredili 50,2% proteina pri čemu je važno napomenuti da je u polaznom materijalu izolacija ulja konoplje provedena ekstrakcijom superkritičnim CO₂ koji je zasigurno superiornija metoda ekstrakcije u usporedbi s ekstrakcijom otapalima ili dobivanja ulja prešanjem kada u pogačama zaostaje znatno više ulja, a što ima utjecaja na rezultate određivanja kemijskog sastava brašna pogača. Stoga se može zaključiti da razlike u udjelu proteina u početnom materijalu tj. brašnu pogače konoplje ovise i o načinu i iskorištenju ekstrakcije ulja konoplje. Nadalje, Tang i sur. (2006.) su u proteinskom izolatu pogače konoplje odredili udio proteina od 86,9% dok je u našem uzorku udio proteinske komponente iznosio 48,12%. Ovo relativno visoko odstupanje od literaturnih podataka je uvjetovano i razlikama u udjelu proteina u početnom materijalu, a jedan od uzroka može biti i razlika u metodologiji izolacije. Naime Tang i sur. (2006.) su u svojoj metodi priprave proteinskog izolata centrifugiranje provodili pri 8000g, a što je zasigurno utjecalo na bolji udio proteina u izolatu.

Osim metodom po Lowryju sadržaj proteina u početnom brašnu pogača lana i konoplje te uzorcima proteinskih izolata određeni su metodom po Kjeldahlu i prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Koncentracije proteina u ishodnom materijalu i izolatima pripremljenim iz pogača lana i konoplje određeni metodom po Kjeldahlu

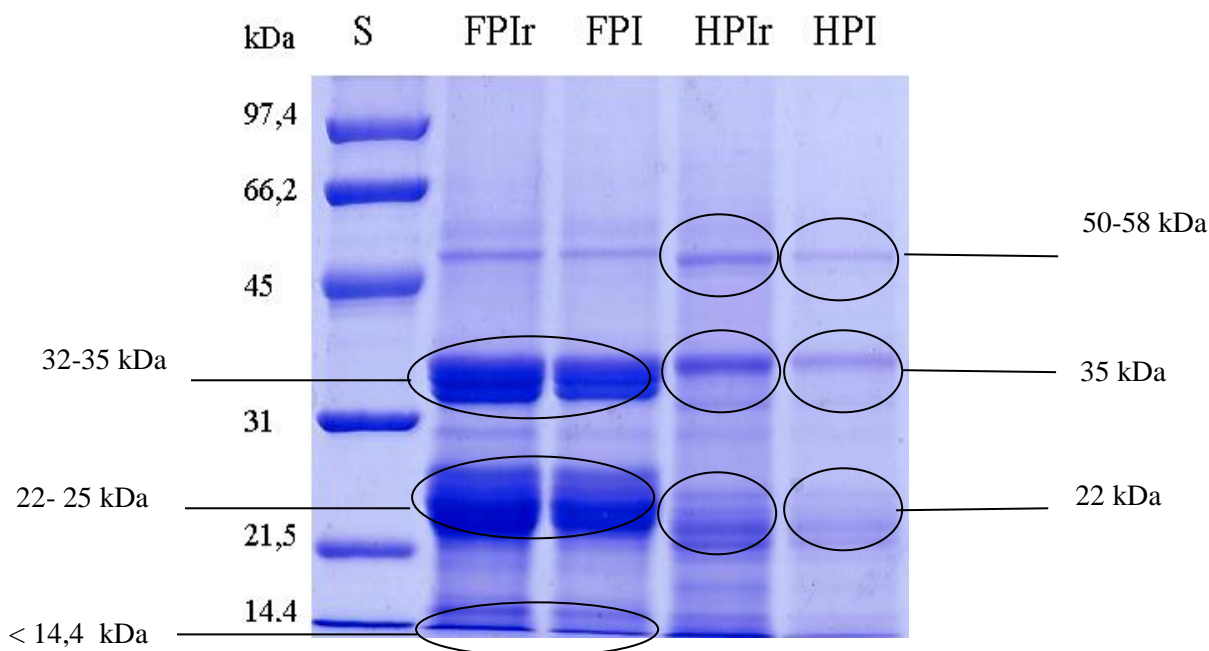
Uzorak	Koncentracija proteina (mg/100 mL)
Brašno lana (FM)	14,68
Brašno konoplje (HM)	24,75
Izolat lana (uzorak 1)	37,0
Izolat lana (uzorak 2)	42,7
Izolat konoplje(uzorak 1)	48,4
Izolat konoplje (uzorak 2)	42,5

Metoda po Kjeldahlu je indirektna metoda određivanja sadržaja proteina budući se oni određuju na temelju količine dušika u uzorcima. Odstupanja u sadržaju proteina izraženija su kod uzoraka lana i konoplje u drugom postupku prijave, a što se može objasniti razlikama u principa obiju metoda odnosno provođenja analitičke metode.

4.2. Karakterizacija proteinskih izolata iz pogača lana i konoplje SDS-PAGE

elektroforezom

U cilju određivanja proteinskih profila izolata proteina iz pogača lana i konoplje napravljena je SDS-PAGE elektroforeza 10x razrijeđenih (FPIr i HPIr) i originalnih uzoraka izolata lana i konoplje (FPI i HPI) koji su prikazani na slici 9.



Slika 9. SDS-PAGE elektroforeza proteinskih izolata iz pogače lana (FPI) i pogače konoplje (HPI); S-standardni proteinski markeri; FPIr i FPI-10x razrijeđeni i originalni uzorci izolata lana; HPIr i HPI- 10x razrijeđeni i originalni uzorci izolata konoplje

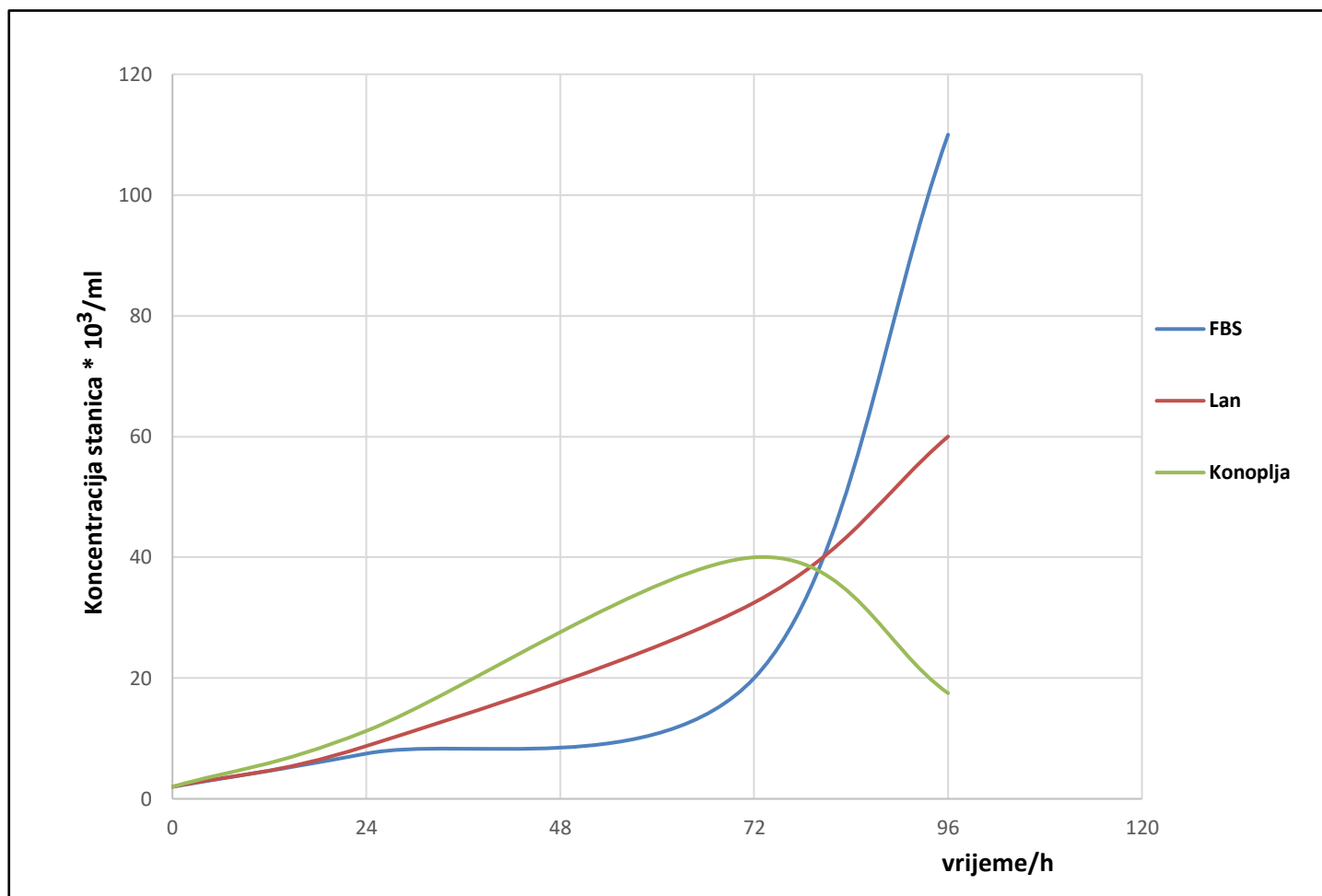
Kao što možemo vidjeti na slici 9., 10x razrijeđeni uzorci proteinskih izolata izraženiji su na gelu zbog veće početne koncentracije proteina dok su uzorci FPI i HPI napravljeni tako da sadrže 20 µg ukupnih proteina. U elektroforegramu uzoraka proteinskih izolata lana najizraženije su vrpce Mr oko 48.5 kDa, dvije vrpce 32-35 kDa te vrpce 22-25 kDa te frakcija ispod 14,4 kDa. Dobiven proteinski profil je karakterističan za proteine lana u reducirajućim uvjetima (Karamać i sur, 2016.). Proteinske vrpce u rasponu 20-48 kDa najvjerojatnije potječu od α - i β - podjedinica 11S globulina koji su dominantni proteini leguminoza i čine oko 66% ukupnih proteina. Albumini proteinskih izolata lana (2S protein) su zbog reducirajućih uvjeta

bez prisutnih disulfidnih mostova i predstavljaju frakcije ispod markera od 14,4 kDa za čiju točniju identifikaciju treba provesti elektroforezu na gušćem gelu.

Zbog prisustva β -merkaptetoetanolu u puferu za elektroforezu kod uzoraka konoplje tj. HPIr i HPI možemo vidjeti 2 podjedinice: kiselu (33 kDa) i baznu (22 kDa) koje odgovaraju proteinu edestinu. Naime, edestin se sastoji od 6 podjedinica pri čemu svaka sadrži kiselu i baznu podjedinicu međusobno povezanih disulfidnom vezom, a koju je u ovom slučaju razorio β -merkaptetoetanol. Edestin je najzastupljeniji protein u proteinskom izolatu konoplje, a dobiveni rezultati su korelaciji s rezultatima koje su objavili Tang i sur. (2006).

4.3. Biološka aktivnost proteinskih izolata iz pogača lana i konoplje na HEK 293T stanicama

Kao bi se ispitao učinak pripremljenih proteinskih izolata iz pogača lana i konoplje u kulturi HEK 293T stanica, stanice su najprije naciepljene u početnoj koncentraciji od 2×10^3 stanica/mL. Nakon 24 h od naciepljivanja i nakon što su se stanice prihvatile za podlogu, medij za uzgoj je zamijenjen novim koji je sadržavao 5% seruma (kontrolne stanice) te medijem u koji je uz 5% seruma sadržavao i 5 g/L proteinskog izolata lana i konoplje. Stanice su inkubirane kroz 96 h i svakih 24 h stanice su brojane u komorici za brojanje stanica uz dodatak boje tripan-plavo (slika 10.)



Slika 10 . Krivulja rasta HEK 293T stanica uz dodatak 5 g/L proteinskih izolata iz pogača lana i konoplje

Kao što možemo vidjeti iz slike 10. , najbolji rast je ostvaren u standardnom mediju za uzgoj s 5% seruma. Stanice kojima je bio dodan izolat lana su rasle tijekom 96 sati uzgoja, ali njihova koncentracija nakon 96 h uzgoja bila je skoro 2x niža nego u standardnom mediju sa serumom (6×10^4 st/mL vs. 11×10^4 st/mL). U uzorku kojem je bio dodan izolat konoplje do 72. sata je bio prisutan rast HEK 293T stanica, nakon čega su stanice počele odumirati. U uzorcima

se pojavilo zamućenje medija zbog kontaminacije ili taloženja komponenti izolata koje su imale inhibicijski učinak na rast HEK 293T stanica. U literaturi je opisan učinak ekstrakata slanutka na tumorske CaCo-2 i normalne J774 stanice porijeklom iz makrofaga (Girón-Calle i sur., 2004). Tijekom 96 h rasta, ispitani uzorci su pokazali i proliferativno i inhibicijsko djelovanje na obje stanične linije ovisno o načinu pripreme uzorka (ekstrakcija vodom, precipitacija pri pI tzv. proteinski koncentrat te tretman proteinskog koncentrata smjesom etanol/acetona). Neosporno je da proteinski izolati uz proteine sadrže i druge tvari koje pokazuju stimulacijsko djelovanje na proliferaciju stanica (bioaktivni spojevi) kao i anti-nutritivne komponente koje imaju inhibicijsko djelovanje na rast stanica i koje bi bilo poželjno ukloniti iz ovih pripravaka.

Ovi preliminarni rezultati djelovanja proteinskih izolata iz pogača lana i konoplje na HEK 293T stanice ne bi trebali biti obeshrabrujući s obzirom da se moguće djelovanje na proliferaciju stanica očekuje od enzimskih hidrolizata za čiju pripravu je potrebno najprije izdvojiti i karakterizirati proteinski izolat. Također, u međuvremenu su u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije napravljeni pokusi utjecaja 10x manjih koncentracija izolata lana i konoplje pri čemu su dobiveni rezultati koji ukazuju na stimulacijski učinak na proliferaciju HEK 293T stanica. Također, ovi rezultati još jednom dokazuju kako je potrebno napraviti veliki broj pokusa kako bi se odredio učinak na kulturama stanica i odabrala optimalna koncentracija proteina sadržanih u izolatima.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata u ovom radu može se zaključiti sljedeće:

1. Pripravljani su proteinski izolati iz pogača lana i konoplje koji su sadržavali 69,41 odnosno 70,64 mg/mL proteina određenih metodom po Lowryju.
2. Udio proteina u izolatima iz pogača lana ovisi o ishodnom materijalu, i iznosio je 60,42 % w/w za lan i 48,12 % w/w za konoplju.
3. Metodom SDS-PAGE elektroforeze određen je proteinski profil u pripremljenim izolatima. U izolatu lana određene su globulinske frakcije, a u izolatu konoplje kao dominantan protein određen je edestin.
4. Ispitivanjem učinka dodatka izolata proteina lana i konoplje u koncentraciji od 5 g/L proteina utvrđeno je da izolat lana nije stimulirao rast HEK 293T stanica u usporedbi sa standardnim medijem s 5% seruma. Izolat konoplje pokazao je inhibicijski učinak na rast HEK 293T stanica.

6. LITERATURA

Andlar, M. (2013) Utjecaj dodatka hidrolizata proteina na rast stanične linije *Channel catfish ovary* (CCO) u mediju bez seruma. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska

Anonymous 1 (2017) < <http://kinesis-usa.com/brand-general-consumables-counting-chamber-blaubrand-neubauer-improved-ivd-w-o-spring-clips-double-rul-bright-line-717810.html> >
Pristupljeno 23.kolovoza 2017.

Ayad, A. A. (2010) Characterization and properties of flaxseed protein fractions. Ph. D. Thesis. McGill University, Montreal, Canada

Callaway, J.C. (2004) Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica* **140**, 65–72.

Chabanon, G., Alves da Costa, L., Farges, B., Harscoat, C., Chenu, S., Georgen, J.L., Marc, A., Marc, I., Chevalot, I. (2008) Influence of the rapeseed protein hydrolysis process on CHO cell growth. *Biores. Technol.* **99**, 7143-7151.

Chun, B. H., Kim, J. H., Lee, H. J., Chung, N. H. (2007) Usability of size-excluded fractions of soy protein hydrolysates for growth and viability of Chinese hamster ovary cells in protein-free suspension culture. *Bioresour. Technol.* **98**, 1000–1005.

Ćapin, M. (2016) Izolacija bioaktivnih spojeva iz nusproizvoda proizvodnje lanenog ulja. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska

Farges-Haddani, B., Tessier, B., Chenu, S., Chevalot, I., Harscoat, C., Marc, I. Goerge, J.L., Marc, A. (2006) Peptide fractions of rapeseed hydrolysates as an alternative to animal proteins in CHO cell culture media. *Proc. Biochem.* **41**, 2297-2304.

Franěk, F., Hohenwarter, O., Katinger, H. (2000) Plant protein hydrolysates: Preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures. *Biotech. Progress.* **16**, 688-692.

Girón-Calle, J., Vioque, J., del Mar Yust, M., Pedroche, J., Alaiz, M., Millán F. (2004) Effect of chickpea aqueous extracts, organic extracts, and protein concentrates on cell proliferation. *J. Med. Food* **7**, 122–129.

Gutierrez, C., Rubilar, M., Jara, C., Verdugo, M., Siniero, J., Shene, C. (2010) Flaxseed and flaxseed cake as a source of compounds for food industry. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **10**, 454 – 463.

Ivanjko, N. (2016) Priprava prirodnih eutektičnih otapala i njihova primjena u krioprotekciji stanične linije HEK 293T. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska

Karamać, M., Kosinska-Cagnazzo, A., Kulczyk, A. (2016) Use of Different Proteases to Obtain Flaxseed Protein Hydrolysates with Antioxidant Activity. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1027.

Karamać, M., Kulczyk, A., Sulewska, K. (2014) Antioxidant Activity of Hydrolysates Prepared from Flaxseed Cake Proteins Using Pancreatin. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **64**, 227–233.

Kim, S.H., Lee, G.M. (2009) Development of serum-free medium supplemented with hydrolysates for the production of therapeutic antibodies in CHO cell cultures using design of experiments. *Appl Microbiol Biotechnol.* **83**, 639-648.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lindl, T., Gstraunthaler, G. (2008). Zell- und Gewebekultur Von den Grundlagen zur Laborbank. 6. izd., Aufl. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag. Berlin.

- Mueller, K., Eisner, P., Yoshie-Stark, Y., Nakada, R., Kirchoff, E. (2010) Functional properties and chemical composition of fractionated brown and yellow linseed meal (*Linum usitatissimum* L). *J. Food Eng.* **98**, 453-460.
- Pasupuleti, V. K., Braun, S. (2010) State of the art manufacturing of protein hydrolysates. U: Protein hydrolysates in biotechnology, (Pasupuleti, V. K., Demain, A. L., ured.), Springer Dordrecht Heilderberg, London/New York, str. 33-55.
- Peričin, D., Radulović-Popović, Lj., Vaštag, Ž., Mađarev-Popović, S., Trivić, S. (2009) Enzymatic hydrolysis of protein isolate from hull-less pumpkin oil cake: Application of response surface methodology. *Food Chem.* **115**, 753-757.
- Pojić, M., Mišan, A., Sakač, M., Dapčević Hadnađev T., Šarić, B., Milovanović, I., Hadnađev, M. (2014) Characterization of Byproducts Originating from Hemp Oil Processing. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 12436–12442.
- Ramachandran, S., Singh, S., K., Larroche, C., Soccol, C., R., Pandey, A. (2006) Oil cakes and their biotechnological applications – A review. *Bioresource Technol.* **98**, 2000–2009.
- Tang, C., Ten, Z., Wang, X., Yang, X. (2006) Physicochemical and Functional Properties of Hemp (*Cannabis sativa* L.) Protein Isolate. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 8945–8950.
- Sung, Y. H., Lim, S. W., Chung, J. Y., Lee, G. M. (2004) Yeast hydrolysate as a low-cost additive to serum-free medium for the production of human thrombopoietin in suspension cultures of Chinese hamster ovary cells. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* **63**, 527-536.

Tang, C., Wang, X., Yang, X. (2009) Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Food Chem.* **114**, 1484-1490.

Tehrani, M., H., H., Batal, R., Kamalinejad, M., Mahbubi, A. (2014) Extraction and purification of flaxseed proteins and studying their antibacterial activities. *J. Plant Sci.* **2**, 70-76.

Udenigwe, C. C., Lu, Y., Han, C., Hou, W., Aluko, R. E. (2009) Flaxseed protein-derived peptide fractions: Antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages. *Food Chem.* **116**, 277-284.

van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, Ä., Gstraunhaler, G., Honegger, P., Knudsen, L. E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M. L. (2010) Optimization of chemically defined cell culture media - Replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicol. in vitro*, **24**, 1053 – 1063.

Varvodić, A. (2015) Uloga *Azotobacter* spp. kao slobodnog nitrofikatora. Diplomski rad, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, Hrvatska

Vaštag, Ž., Popović, Lj., Popović, S., Krimer, V., Peričin, D. (2011) Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chem.* **124**, 1316-1321.

Wang, X., Tang, C., Chang, L., Yang, X. (2009) Characterization and Antioxidant Properties of Hemp Protein Hydrolysates Obtained with Neutrase. *Food Technol. Biotechnol.* **47**, 428–434.